

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

PATENT

In re application of: **Masao WASHIZU et al.**

Serial No.: **Not Yet Assigned**

Filed: **April 13, 2001**

For: **ELECTRODE FOR DIELECTROPHORETIC APPARATUS,
DIELECTROPHORETIC APPARATUS, METHOD FOR MANUFACTURING
THE SAME, AND METHOD FOR SEPARATING SUBSTANCES USING THE
ELECTRODE OR DIELECTROPHORETIC APPARATUS**

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

April 13, 2001

Sir:

The benefit of the filing dates of the following prior foreign applications is hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

Japanese Appln. No. 2000-112337, filed on April 13, 2000; and

Japanese Appln. No. 2000-374210, filed on December 8, 2000.

In support of this claim, the requisite certified copies of said original foreign applications are filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copies.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 01-2340.

Respectfully submitted,
ARMSTRONG, WESTERMAN, HATTORI
MCLELAND & NAUGHTON, LLP



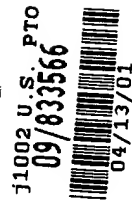
Donald W. Hanson
Reg. No. 27,133

Atty. Docket No.: 010516
Suite 1000, 1725 K Street, N.W.
Washington, D.C. 20006
Tel: (202) 659-2930
Fax: (202) 887-0357
DWH/yap



#5
OK,
5/22/01

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年 4月13日

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-112337

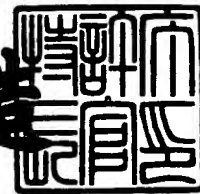
出 願 人
Applicant(s):

和光純薬工業株式会社

2001年 3月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3016201

【書類名】 特許願
【整理番号】 P017
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区浄土寺上馬場町 1 1 9

サラヴィー 1 1 9 - 4 0

2

和光純薬

工業株式会社内

【氏名】 齋津 正夫

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県尼崎市高田町 6 番 1 号 和光純薬工業株式会社

大阪研究所内

【氏名】 川端 智久

【特許出願人】

【識別番号】 000252300

【氏名又は名称】 和光純薬工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080274

【弁理士】

【氏名又は名称】 稲垣 仁義

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 040383

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9304839

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 誘電泳動装置、その製法及び該装置を使用する物質の分離方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基板上に電極を設けた誘電泳動装置において、対向する前記電極間に、不均一電界領域の増加を実現する構造を形成したことを特徴とする誘電泳動装置。

【請求項 2】 基板上に電極を設けた誘電泳動装置において、対向する前記電極間に該電極よりも低い部位を形成したことを特徴とする誘電泳動装置。

【請求項 3】 前記電極を前記基板上の凸状物で保持して、前記対向する前記電極間に該電極よりも低い部位を形成する請求項 2 に記載の誘電泳動装置。

【請求項 4】 物理的又は／及び化学的手段により電極間の基板を掘削して、対向する前記電極間に該電極よりも低い部位を形成したことを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の誘電泳動装置の製造方法。

【請求項 5】 前記化学的手段が、誘電泳動装置の基板に対するエッチング液を用いるエッチングである請求項 4 に記載の誘電泳動装置の製造方法。

【請求項 6】 誘電泳動電極により形成された不均一電界内に、分離すべき物質を含む液体を存在させ、該物質に働く誘電泳動力の差によって分離を行う物質の分離方法において、対向する電極間に形成した電極よりも低い部位により、不均一電界領域の増加を実現することによって、物質の捕集能力を向上させたことを特徴とする物質の分離方法。

【請求項 7】 誘電泳動電極により形成された不均一電界内に、分離すべき物質を含む液体を流し、該物質に働く誘電泳動力と流体抗力の相互作用によって分離を行う物質の分離方法において、対向する電極間に形成した電極よりも低い部位により、不均一電界領域の増加と流体抗力の低減を実現することによって、物質の捕集能力を向上させる請求項 6 に記載の分離方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明が属する技術分野】

この発明は、捕集能力を向上させた誘電泳動装置、その製法及び該装置を使用

する物質の分離方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、半導体技術の進歩によりフォトリソグラフィー等の微細加工技術によってnmから μm 単位での物質加工技術が確立され、現在もその微細加工技術は進歩しつづけている。

【0003】

化学・生化学分野に於いては、この微細加工技術を利用して、生体試料からの分析対象成分の抽出（抽出工程）、化学・生化学反応を用いる当該成分の分析（分析工程）、並びにそれに続く分離処理（分離工程）及び検出（検出工程）といった一連の化学的・生化学的分析工程の全てを一辺数cm～数十cmのチップ上に集積化等した極小の分析装置を用いて行う、微細総分析システム〔Micro Total Analysis System（ μ -TAS）、Laboratory on a chip〕と呼ばれる新技術が発展しつつある。

【0004】

この μ -TASの手法は、化学的・生化学的分析工程全てを通じて、分析時間の短縮化、使用するサンプル量や化学・生化学反応に必要な試薬量の低減化、分析機器や分析スペースの縮小化に大きく貢献するものと期待されている。

【0005】

特に、 μ -TASに於ける分離工程については、テフロンやシリカ等を材料として作製された内径1mm以下のキャピラリー（細管）を分離カラムとして使用して高電界中で物質の持つ電荷の差を利用して分離を行うキャピラリー電気泳動法や、同様のキャピラリーを用いてカラム担体と物質との相互作用の差を利用して分離を行うキャピラリーカラムクロマトグラフィー法が開発されている。

【0006】

しかしながら、キャピラリー電気泳動法は、分離に高電圧が必要であることや、検出領域でのキャピラリー容量が制約されるため検出感度が低いという問題、更には、チップ上のキャピラリーチップでは、分離のためのキャピラリー長に制約があり、高分子の分離に十分なキャピラリー長が得られないため、低分子の物

質の分離には適しているが高分子の物質の分離には適さないという問題を有している。また、キャピラリーカラムクロマトグラフィー法は、分離処理の高速化に限界があり、処理時間の短縮化が困難であるという問題を有している。

【0007】

そこで、近年、上記した如き問題を解決する手段の一つとして、物質を不均一な交流電界内に置くと、物質内に正と負の分極が起こり、物質を取り囲む媒質の誘電率が物質よりも大きいと物質は電界の低い方向へ移動し、媒質の誘電率が物質よりも小さいと物質は電界の強い方向へと移動する力が働く現象、いわゆる誘電泳動力 [H.A.Pohl: "Dielectrophoresis", Cambridge Univ. Press (1978)、T.B.Jones: "Electromechanics of Particles", Cambridge Univ. Press (1995) 等] を利用した分離方法が、注目されている。

【0008】

この分離方法は、(1) 誘電泳動力の大きさは、物質(粒子)の大きさ・誘電的性質に依存し、電界傾度に比例するため、微細加工電極を用いれば、電界および電界傾度をきわめて大きくとることができるので、キャピラリー電気泳動のように高電圧を必要とせず、低い印加電圧で高速な分離が期待できる、(2) 電界の強い場所が微小領域に極限されるため、電界印加による温度上昇も最小限にとどめることができ、また、高電界場の形成が可能となる、(3) 誘電泳動は、電界傾度に比例する力であることからわかるように、印加電圧の極性に依存しないので、交流電界下でも直流同様に力が働く。従って、高周波交流を用いれば水溶液での電極反応(電気分解反応)は抑えられるので、電極自体をチャンネル(サンプル流路)中に集積化することが可能となる、(4) キャピラリー電気泳動のように検出部分のチャンバ容量に制約がないことから検出感度の向上も望める、等の点から、現在では μ -TASに於ける最も適した分離方法と考えられている。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、誘電泳動の μ -TASへの応用を考えた場合、捕集能力を向上させることは、極めて重大なことであり、この点で従来の誘電泳動装置は未だ十分満足すべきものではない。

【0 0 1 0】

即ち、物質の捕集能力が向上すれば、電極領域での分離が可能となることと、効率よく保持することによって、S/N（シグナル／ノイズ）比の高い分離が実現される。また例えば、特に物質に働く誘電泳動力と流体抗力との相互作用によって分離を行うField-Flow fractionationにおいては、同じ流速でも短い電極領域での分離が可能となるからである。

【0 0 1 1】

この発明のうち請求項1及び2に記載の発明は、このような点に着目してなされたものであり、誘電泳動電極により形成された不均一電界内に分離すべき物質を含む液体を存在させ、該物質に働く誘電泳動力によって分離を行う装置において、物質の捕集能力を向上させた誘電泳動装置を提供することを目的とする。

【0 0 1 2】

請求項4に記載の発明は、請求項1に記載の装置を製造する方法を提供することを目的とする。

【0 0 1 3】

また、請求項7に記載の発明は、請求項1に記載の装置を使用した物質の分離方法を提供することを目的とする。

【0 0 1 4】

【課題を解決するための手段】

上記問題点を解決するため本発明者等は鋭意研究の結果、電極と電極の基板部分を掘削し、該電極よりも低い部位を形成することによって、不均一電界領域が増大することと流体の抗力が低減することから、捕集能力が向上することを想到し、本発明に到達した。

【0 0 1 5】

しかして、従来、誘電泳動力を利用した分離装置及び方法、特にField-Flow fractionationにおける装置及び方法についての特許及び論文は多数見られるが、「電極よりも低い部位」を形成させることによって物質の捕集能力を向上させる装置及び方法は全く知られていないし、このような発想も全く知られていない。

【0 0 1 6】

本発明のうち、請求項 1 記載の発明は、基板上に電極を設けた誘電泳動装置において、対向する前記電極間に、不均一電界領域の増加を実現する手段を形成したことを特徴とする。

【 0 0 1 7 】

請求項 2 記載の発明は、不均一電界領域の増加を実現する手段として、対向する電極間に該電極よりも低い部位を形成したことを特徴とする。「電極よりも低い部位」を形成することによって、電極間の上方だけでなく下方にも電解が形成されるので不均一電界領域が増加し、更には、例えば Field-Flow fractionation に用いた場合には、この部分の流体の流速が落ちるので流体抗力が低減することから、物質の捕集能力が向上する。

【 0 0 1 8 】

また、請求項 4 記載の発明は、物理的又は／及び化学的手段により電極間の基板を掘削して、対向する前記電極間に該電極よりも低い部位を形成したことを特徴とする。ここで、物理的手段とは、例えば適当な刃物等を使用して掘削する方法、例えばシンクロトロン放射光を用いる L I G A (Lithographile Galvanoformung Abformung) 法等のことであり、また、化学的手段とは、例えば基板に対するエッチング液を用いて基板を掘削するエッチング等のことである。また、例えば物理的掘削と化学的掘削とを同時に行う、高周波電源によりプラズマとした反応性ガスを用いるエッチング〔反応性イオンエッチング：Reactive Ion Etching (RIE)〕によっても電極間の基板を掘削することができる。尚、上記した如き手段を適宜組み合わせることで基板の掘削を行っても良い。

【 0 0 1 9 】

また、請求項 6 に記載の発明は、誘電泳動電極により形成された不均一電界内に分離すべき物質を含む液体を存在させ、該物質に働く誘電泳動力の差によって分離を行う物質の分離方法において、対向する電極間に形成した電極よりも低い部位により、不均一電界領域の増加を実現することによって、捕集能力を向上させたことを特徴とする。

【 0 0 2 0 】

尚、誘電泳動 (Dielectrophoresis, DEP) とは、物質の電導率及び誘電率と媒

質の電導率及び誘電率と、印加する周波数との相互作用により、不均一な電界内で中性粒子が移動する現象のことであり、この際に分子に働く力を誘電泳動力と呼ぶ。また、誘電泳動力は、物質が電界の強い方へと移動する正の誘電泳動力と電界の弱い方へと移動する負の誘電泳動力の2種類に分けられる。

以下に、分子に正の誘電泳動力が働く場合を例にとり説明する。

【0021】

即ち、電界内に置かれた中性分子には、図1に示すように電界の下流側に正極性の分極電荷 $+q$ が、上流側には負極性の分極電荷 $-q$ が夫々誘導され、 $+q$ には電界 E により大きさ $+qE$ の力が働き、この部分を電界の上流側へと引く。分子が中性ならば、 $+q$ と $-q$ の絶対値は等しく、仮に電界が場所によらず一定であるならば、両者に働く力は釣り合っ分子は動かない。しかし、電界が一様でない場合には、強い電界側へ引く力の方が大きくなり、分子は電界の強い側へと駆動されることとなる。

【0022】

上記したように、溶液中の分子は、該分子に生じる誘電泳動力に応じて電界領域内を種々移動するが、例えばField-Flow fractionationにおける分子の運動は、該分子に生じる誘電泳動力 F_d の他に、流体抗力（流路内の流れによる抗力） F_v と熱運動による力 F_{th} の3つの要因により支配される。即ち、① $F_d \gg F_v + F_{th}$ の場合には、分子は電極に捕集（トラップ）され、② $F_d \ll F_v + F_{th}$ の場合には、電界に関わらず、分子は流路内の流れにのって流出する。また、③ $F_d \approx F_v + F_{th}$ の場合には、分子は電極に吸着・脱着を繰り返しながら下流へと運ばれる結果、本来の流路内の流れよりも遅れて出口に到達する。

【0023】

本発明においては、対向する電極間を深く掘削することによって、電極間の下方にも不均一電界が形成されるから、不均一電界領域が増加することと、この部分の流体の流れが遅くなり、流体の抗力 F_v が低減することから、上記①の如き条件で F_d がより大となり、 F_v がより小となるから、捕集率が向上する。また、電極間の下方に形成された電界にトラップされた粒子は、「電極よりも低い部位」に位置することとなるから、流出され難くなる。

【 0 0 2 4 】

【発明の実施の形態】

次に、本発明の実施の形態を説明する。

【 0 0 2 5 】

図 2 は、本発明の実施例を示すものであり、基板（ガラス基板） 1 上の凸状物（支柱） 2 で、長さ方向に間隔付けて電極 3 を支持した例を示す。

【 0 0 2 6 】

対向する電極 3， 3 間には、図 2（B）に示すように、断面半円状の「電極よりも低い部位」（連通溝） 4 が形成され、隣接する連通溝 4， 4 は、図 2（A）に示すように、凸状物 2 以外の部分で連通するようになっている。しかしながら、図 3（B）に示すように、電極 3 を壁体（凸状物） 2' で支持し、隣接する溝 4'， 4' を同壁体 2' で隔離して、連通しないようにしても差し支えない。

【 0 0 2 7 】

また、図 2 及び図 3 に示す実施例では、凸状物 2 及び 2' 以外の部分は「電極 3 よりも低い部位」（ 4 及び 4' ）に形成されている。

【 0 0 2 8 】

しかしながら、対向する電極 3， 3 間の一部に、凹部（穴）を単独若しくは間隔付けて複数設けても差し支えないが、図 2 及び図 3 に示すように、対向する電極の全部若しくは大部分を電極よりも低い部位（ 4 若しくは 4' ）に形成する方が、捕集能力が向上することから好ましい。

【 0 0 2 9 】

対向する電極 3， 3 間の一部に、凹部（穴）を設ける場合は、対向する電極間の最小ギャップ間 5 に設けるのが好ましい。この部分が電界強度が強いので、この部分に設ければ、捕集能力がより向上するからである。しかしながら、この部分を含んだ全体に形成すれば、分子をトラップする部分が増大するから、更に捕集能力が向上する。

【 0 0 3 0 】

溝 4 の広さ（図 2 及び図 3 に示す場合は、電極 3， 3 間の距離と同じ）は、電界強度に大きく影響するが、誘導泳動対象とする物質の大きさによって適宜決定

するものであり一概には言えない。その大きさがマイクロメートルサイズの物質では、好ましくはその物質が持つ直径の100倍以下1倍以上、更に好ましくは10倍以下1倍以上の広さとするのが良い。また、タンパク質、遺伝子等の生体分子の場合、例えばペプチド鎖、タンパク質等では、通常10 μ m以下1 nm以上、好ましくは5 μ m以下1 nm以上であり、ヌクレオチド鎖（ポリヌクレオチド、オリゴグクレオチド）等の場合、通常100 μ m以下1 nm以上、好ましくは50 μ m以下1 nm以上とするのが良い。

【0031】

一般には、深いほど分子をトラップする部分が増大し、更には特にField-Flow fractionationの場合には、溝の部分での流速が抑えられ捕集能力（捕集率）が向上する。しかしながら、深すぎると、誘電泳動によって電極上にトラップした分子を測定する必要がある場合、トラップされていた分子が溝部分から放出され難いか、放出されない場合が生じる。従って、溝の深さは、好ましくは溝の広さの10倍以下1/1000倍以上、更に好ましくは1倍以下1/1000倍以上である。

【0032】

溝の深さは、図2及び図3(A)に示すような等方性エッチングにより形成すれば、電極幅以上に掘ると電極3を保持している凸状物2が全て削り取られるので、電極3が剥離する。従って、この方法で溝を形成する場合は、溝の深さは、最大電極幅部分の1/2以下となる。

【0033】

図3(B)に示すように、シリコンウェハーの異方性エッチングにより形成する場合は、55度の角度で深さ方向のみにエッチングが進む。従って、この方法でエッチングする場合は、深さ方向の最大距離は、（電極間の距離÷2）×1.42（tan 55度）となる。

図3(C)に示すように、RIEやLIGA等により形成する場合は、ほぼ垂直にエッチングが進む。従って、これらの方法でエッチングする場合は、溝の深さは、前述した範囲、即ち、好ましくは溝の深さの10倍以下1/1000倍以上、更に好ましくは1倍以下1/1000倍以上である。

【 0 0 3 4 】

溝の間隔（＝電極自体の幅）は、正の誘電泳動による分離に限定すれば、分離対象によって左右されない。微細加工技術の加工精度から、通常は $50\ \mu\text{m}$ 以下 $1\ \text{nm}$ 以上、好ましくは $10\ \mu\text{m}$ 以下 $1\ \text{nm}$ 以上である。

【 0 0 3 5 】

図 3（A）に示す等方性エッチングは、ガラス基板若しくはプラスチック基板をエッチングすることにより形成される。等方性エッチングは、基板上の壁体 2 上で電極 3 を支持し、隣接する溝 4，4 は同壁体 2 で隔離されるように形成される場合や、基板上の凸状物 2 で電極 3 を支持し、隣接する溝（連通溝）4，4 は連通するように形成される場合等、エッチングの程度により種々の形状が形成される。

【 0 0 3 6 】

図 3（B）に示す異方性エッチングは、シリコン基板をエッチングすることにより形成される。この場合は、基板上の壁体 2' 上で電極 3 を支持し、隣接する溝 4'，4' は同壁体 2' で隔離されるようになっている。

図 3（C）に示す R I E は、シリコンや SiO_2 基板等をエッチングすることにより形成され、また、L I G A は、ポリマー、セラミック、プラスチック基板等をエッチングすることにより形成される。これらの場合は、基板上の壁体 2'' 上で電極 3 を支持し、隣接する溝 4''，4'' は同壁体 2'' で隔離されるようになっている。

【 0 0 3 7 】

図 2 及び図 3（A）に示す等方性エッチングでは、一般には、溝又は連通溝 4 は断面が半円若しくは半楕円形のような形状に形成される。図 3（B）に示す異方性エッチングで溝を形成すると、一般には、溝 4' は断面略台形を通過して最終的に略 V 字形にエッチングされる。また、図 3（C）に示す R I E や L I G A 等で溝を形成すると、一般には、ほぼ断面方形にエッチングされる。従って、エッチングの仕方及び「電極より低い部位」の形成の仕方によって、種々の断面形状のものが形成されるが、本発明においては「電極より低い部位」（連通溝、溝、凹部等）の形状は特に限定されない。

【 0 0 3 8 】

図 3 (A) の壁体又は凸状物 2 は、中央部が括れた形状に形成され、図 3 (B) の壁体 2' は、台形に形成され、また、図 3 (C) の壁体 2'' は、方形に形成されているが、壁体又は凸状物 2、壁体 2' 及び壁体 2'' は、電極 3 を支持し得るならどのような形状でも良く、特に限定されない。

【 0 0 3 9 】

本発明に使用する電極 3 は、例えばアルミニウム、金等の導電性の材質からなり、その構造は、誘電泳動力、即ち、水平及び垂直方向に不均一電界を生じ得るものであればよく、例えば、インターデジタル形状 [J. Phys. D: Appl. Phys. 25, 81-88, (1992)、Biochim. Biophys. Acta., 964, 221-230, (1988)等] が挙げられる。

【 0 0 4 0 】

より具体的には、図 4 に示すように、(A) 直線状の帯状部 6 の上下に対向して三角形の外方突出部 7 a を間隔付けて多数形成した形状、(B) 直線状の帯状部 6 の上下に対向して四角形の外方突出部 7 b を間隔付けて多数形成した形状、(C) 直線状の帯状部 6 の上下に対向して台形の外方突出部 7 c を間隔付けて多数形成した形状、(D) 上下に正弦波形であり、同正弦波の凸部 8 と凹部 9 (凹部 9 と凸部 8) とが上下に対向して直線状に多数連設された形状、(D) 上下に鋸歯形であり、同鋸歯の凸部 8' と凹部 9' (凹部 9' と凸部 8') とが上下に対向して直線状に多数連設された形状が好ましい。しかしながら、誘電泳動に使用し得る電極であれば、どのようなものでも使用することが出来、特に限定されない。

【 0 0 4 1 】

このような電極は、通常、例えばガラス、プラスチック、石英、シリコン等の非導電性の材質からなる基板上に、それ自体公知の微細加工技術 [Biochim. Biophys. Acta., 964, 221-230等] を用いて、1 対以上の上記した如き形状の電極を櫛歯状に設けることにより作製される。また、対向 (隣接) する電極 3 間の距離は、強電界強度の不均一交流電界を形成し得るものであれば特に限定されず、目的の分子の種類により適宜設定すべきものである。

【 0 0 4 2 】

電極 3 の厚さは、従来と同様で良く、具体的には、通常 0. 5 n m 以上、好ましくは 0. 5 n m ~ 1 n m、更に好ましくは 1 n m ~ 1 0 0 0 n m である。

【 0 0 4 3 】

電極 3 は、厚さ以外は、従来と同様で良く、電極上への種々の物質の吸着防止のため、有機薄膜を電極にコーティングしても差し支えない。

【 0 0 4 4 】

上記本発明の誘電泳動装置を製造するには、誘電泳動電極及び流路のような「電極よりも低い部位」（連通溝 4、溝 4'、凹部等）以外は、従来と同様に形成すれば良い。

【 0 0 4 5 】

「電極よりも低い部位」を形成するには、例えば適当な刃物等を使用して掘削する方法や例えばシンクロトロン放射光を用いる L I G A (Lithographile Galvanoformung Abformung) 法等の物理的手段、例えば基板に対するエッチング液を用いて基板を掘削するエッチング等の化学的手段、又は、高周波電源によりプラズマとした反応性ガスを用いるエッチング [反応性イオンエッチング: Reactive Ion Etching (RIE)] 等の物理的及び化学的手段、等により電極間の基板を掘削して形成すればよい。尚、上記した如き手段を適宜組み合わせて基板の掘削を行っても良い

【 0 0 4 6 】

エッチング液は、基板の材質に応じて公知のエッチング液を選択すれば良く、また基板の一部に電極よりも低い部分を形成する場合は、掘削したくない部分を適当にマスキングしてエッチングすれば良い。

【 0 0 4 7 】

本発明の誘電泳動装置を使用して、本発明の分離方法を実施するには、分離方法自体は従来と同じように行えばよい。

【 0 0 4 8 】

即ち、上記した如き電極（電極基板）を用いて形成させた不均一電界内に、分離すべき物質を含む液体、例えば 2 種以上の物質（分子若しくは粒子）が溶解若

しくは懸濁している液体を存在させて、当該物質に働く誘電泳動力の差によって分離すれば良い。

【0049】

一般には、基板上の流路内に水平及び垂直方向に不均一な電界を形成させ、入口から分離すべき物質を含む液体を流して、当該物質に働く誘電泳動力の差によって分離すれば良い。しかしながら、流れを生じさせることなく、電極の特定部分に保持される成分と保持されない成分とに分離しても勿論良い。

【0050】

物質（分子、粒子）に働く誘電泳動力の差によって分離するには、電極の特定部分に保持される分子等と保持されない分子等とに分離したり、より強い誘電泳動力を受ける分子等は弱い誘電泳動力を受ける分子等よりも遅延して移動するため、移動時間に差が生じることを利用して分離したりすれば良い。

【0051】

図5の矢印で示すように、本発明の装置の流路に電極の長さ方向と交差する方向から分離すべき物質を含む液体を流すと、連通溝4の中の流速は流路部分に比べて遅くなり、連通溝4の中に入った分子にかかる流体の抗力 F_v を減らすことが出来る。また、電極3, 3間に連通溝4を形成したことによって、電界の影響範囲が広くなることと、トラップされた分子がストックされる場所が広がることから、捕集率が向上したものと思われる。

【0052】

本発明の測定方法は、本発明の分離方法を利用する以外は、上記した如きそれ自体公知の方法に準じて実施すればよく、使用される試薬類も、それ自体公知の試薬類の中から適宜選択すればよい。

【0053】

以下に実施例及び参考例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。

【0054】

【実施例】

参考例 1：誘電泳動電極基板の作製

最小ギャップ $7\mu\text{m}$ 、電極ピッチ $20\mu\text{m}$ 、電極数2016(1008対)の多段電極列を設計し、それに基づいて、電極作製のフォトマスクを作製した。

【0055】

即ち、アルミ蒸着したガラス基板にレジストを塗布して、電子ビーム描画装置にて上記設計通りの電極パターンを描画した後、レジストを現像し、アルミをエッチングすることによってフォトマスクを作製した。

【0056】

電極基板の作製は、図解フォトファブリケーション、橋本貴夫著、総合電子出版、(1985)に記載の方法に準じて以下の如く行った。

【0057】

即ち、上記の如くして作製したフォトマスクと、レジストを塗布したアルミ蒸着ガラス基板を密着させたのち、水銀ランプで電極パターンを露光した。露光後の電極用ガラス基板はレジストの現像、アルミ面のエッチングに続き、アルミ面に残ったレジストを除去することによって電極基板を作製した。

【0058】

実施例 1：エッチングにより基板に「電極よりも低い部位」を形成

図6に示すように、参考例1に記載のようにして作製した誘導泳動電極のガラス基板1をエッチングして、基板1の電極3対向部に連通溝4を形成した。

【0059】

エッチング液として、フッ化ナトリウム硫酸(NH_4F 3%、 H_2SO_4 、 H_2O)を使用した。フッ化ナトリウム硫酸は、ガラス、アルミの両方を溶かす性質を有するが、ガラスをエッチングする速度は、アルミをエッチングする速度に比べて非常に早いので、アルミ電極をマスクとしてアルミ電極以外のガラス部分をエッチングすることが出来る。

【0060】

電極のアルミの厚さを 40nm とすると、深さ $3\mu\text{m}$ 以上エッチングすると、エッチング液を純水で洗浄する時に、電極が水流によって折れ曲がる様子が観察されるが、 250nm の厚さで行うと電極が折れ曲がる現象は観察されなかった。

【 0 0 6 1 】

上記のようにエッチングして、エッチング時間 (s e c .) と電極間に形成される連通溝の深さ (μ m) との関係を測定した。結果は、図 7 に示すように、エッチング時間と形成される溝の深さとは、比例関係を示した。尚、溝の深さは、電極をガラス切りで切断し、断面を顕微鏡で観察して測定した。

参考例 2 流路を有する電極基板の作製

不均一電界中に分子を移動させることによる分子の分離を行うため、実施例 1 で作製した電極基板上にシリコンゴムを用いて流路を作製した。

【 0 0 6 2 】

電極上に分子が溶解した溶液を送流するためのシリコンゴム流路は、深さ 25 μ m、幅 400 μ m で、電極基板上の電極が配置されている領域を通るように設計した。

【 0 0 6 3 】

作製は、図解フォトファブ리케이션、橋本貴夫著、総合電子出版、1985 に記載の方法に準じて行った。まず、ガラス板上に厚さ 25 μ m のシート状ネガレジストを貼り付けた後、流路作製用に設計したフォトマスクを用いて露光した後、ネガレジストの現像を行った。このネガレジスト基板を鋳型として未硬化のシリコンゴムを流し込んだ後、硬化させることによって、電極が配置されている部分に高さ 25 μ m の凹面を持つシリコンゴムを作製した。

【 0 0 6 4 】

電極基板とシリコンゴム流路を、電極基板上の電極が配置されている領域にシリコンゴム凹面があうように 2 液硬化型シリコンゴムで接着し、流路上流部に、溶液注入用のシリンジを差し込み、該電極基板に、電極上を分子が溶解している溶液を送流させる装置を付加した。

【 0 0 6 5 】

実施例 2 牛血清アルブミン (B S A) タンパクについての捕集率の測定

実施例 1 のようにして、深さ 2 μ m 又は 4 μ m の連通溝を形成した電極を作製し、参考例 2 に記載のように流路を形成して、本発明の誘導泳動クロマトグラフィー装置を作製し、下記のようにしてこの装置の捕集率を測定した。尚、比較の

ため、連通溝を形成しない以外は同様にして作製した誘導泳動クロマトグラフィー装置についても捕集率を測定した。

【0066】

(試料)

サンプルとして、FITC標識されたBSA（分子量約65kD）60 μ g/mlを用いた。

【0067】

(操作)

タンパク分子の電極基板や流路への吸着を防止するため、ブロックA（雪印乳業（株）社製）を用いて流路表面をブロッキングした後、FITC標識BSAを誘導泳動クロマトグラフィーに供した。

【0068】

使用したサンプルの平均流速は556 μ m/sec.であり、電界印加は測定開始から30～120秒の間に行った。この時の印加する電界強度は、2.14Mv/m、2.5Mv/m、2.86Mv/mの3種類について捕集率を測定した。

【0069】

捕集率の測定は、次式により求めた。

【0070】

$$\text{捕集率 (\%)} = [(I_0 - I_{\min}) \times 100] / (I_0 - I_{\text{back}})$$

式中、 I_0 は、電界印加前の蛍光強度の定常値を表し、 I_{\min} は、電界印加中の蛍光強度の最小値を表し、 I_{back} は、バックグラウンドを表す。

(結果)

結果を図8に示す。尚、図8中、 \triangle は深さ4 μ m、 \square は深さ2 μ m、 \diamond は深さ0 μ mの誘導泳動クロマトグラフィー装置を使用した結果を表す。

【0071】

図8の結果から明らかなように、溝の深さが深いほど捕集率(%)が向上し、2.86Mv/mでは、4 μ mの連通溝を持つ本発明の装置は、持たない従来の装置の捕集率28%と比べて40%であり、捕集率が約43%向上すること、言

い換えれば、このように本発明の装置を使用することにより目的物質の捕集能力が著しく向上することが判る。

【0072】

実施例 3 : 500 b p DNA についての捕集率の測定

インターカーレーター蛍光色素 YOYO-1 (モレキュラープローブ社) で標識した 500 b p DNA を試料として使用し、実施例 2 と同様にして、溝の深さ 0 μ m、2 μ m 及び 4 μ m の誘導泳動クロマトグラフィー装置により捕集率 (%) を測定した。

【0073】

結果を図 9 に示す。尚、図 9 中、 \triangle は深さ 4 μ m、 \square は深さ 2 μ m、 \diamond は深さ 0 μ m の連通溝を有する誘導泳動クロマトグラフィー装置を使用した結果を表す。

【0074】

図 9 の結果から明らかなように、この場合でも 1.5 Mv / m 以上の電界強度において、深さ 4 μ m の連通溝を形成した本発明の装置は、連通溝を有しない従来の装置より、約 20 % 程度捕集率 (%) が向上した。

【0075】

【発明の効果】

以上述べた如く、本発明によれば、対向する電極間に電極よりも低い部位を設けるという従来全く行われていなかったことを行うことによって、誘導泳動による物質の分離に極めて重要な役割を有する捕集率が著しく向上するという絶大な効果を奏するものであり、それゆえ極めて画期的な発明である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

誘電泳動の原理を示す図である。

【図 2】

本発明の実施例を示す平面図 (A) と断面図 (B) である。

【図 3】

等方性エッチング (A)、異方性エッチング (B)、及び R I E 若しくは L I

GA (C) により形成した本発明の「電極よりも低い部位」の例を示す断面図である。

【図 4】

本発明に使用する電極の例を示す平面図である。

【図 5】

本発明の誘導泳動クロマトグラフィー装置の断面図である。

【図 6】

本発明の方法により基板に「電極よりも低い部位」を形成する例を示す断面図である。

【図 7】

実施例 1 で測定したエッチング時間と溝の深さとの関係を示すグラフである。

【図 8】

本発明の誘導泳動クロマトグラフィー装置と従来の誘導泳動クロマトグラフィー装置を使用して、牛血清アルブミン (BSA) タンパクについて捕集率を測定したグラフである。

【図 9】

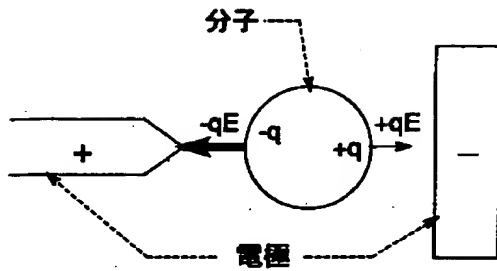
本発明の誘導泳動クロマトグラフィー装置と従来の誘導泳動クロマトグラフィー装置を使用して、500bp DNA について捕集率を測定したグラフである。

【符号の説明】

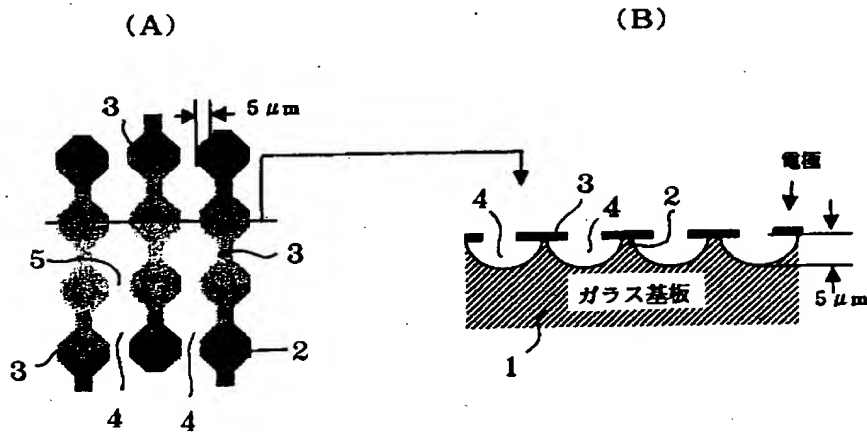
- 1 : 基板
- 2 : 凸状物 (支柱)
- 2' : 凸状物 (壁体)
- 3 : 電極
- 4 : 電極よりも低い部位 (連通溝)
- 4' : 電極よりも低い部位 (溝)
- 5 : 電極間の最小ギャップ

【書類名】 図面

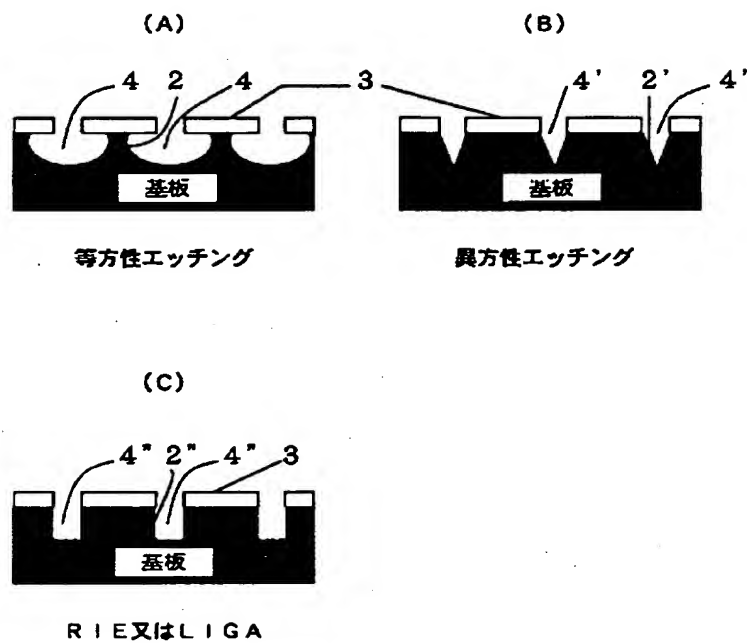
【図 1】



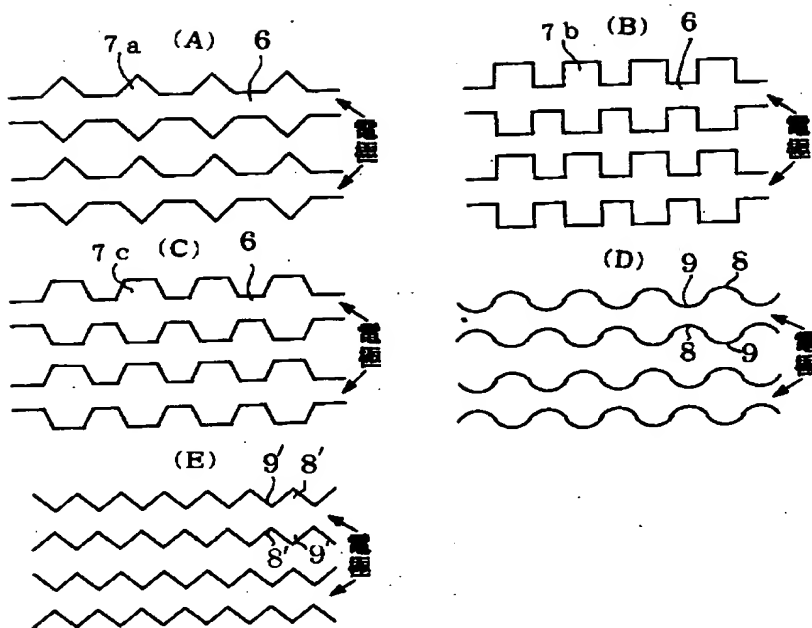
【図 2】



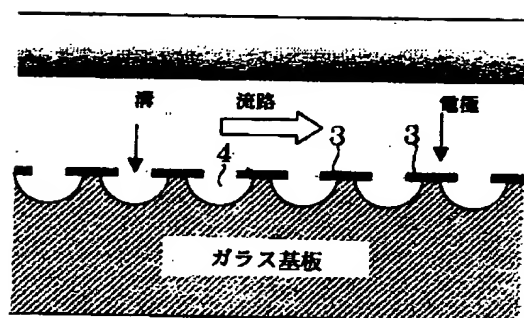
【図 3】



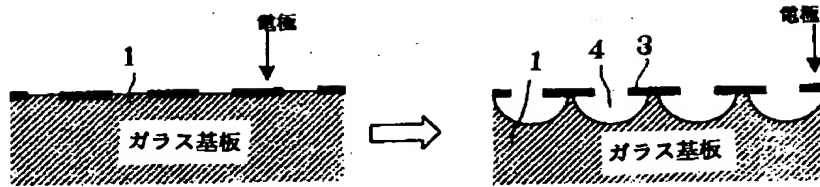
【図 4】



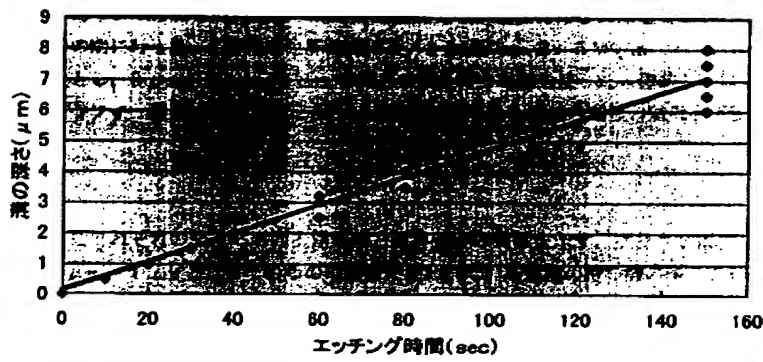
【図 5】



【図 6】

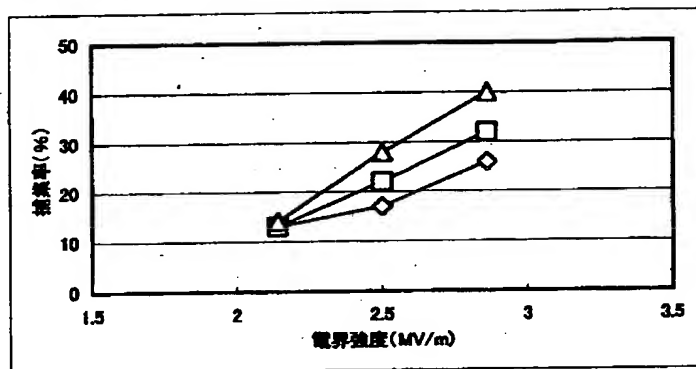


【図 7】



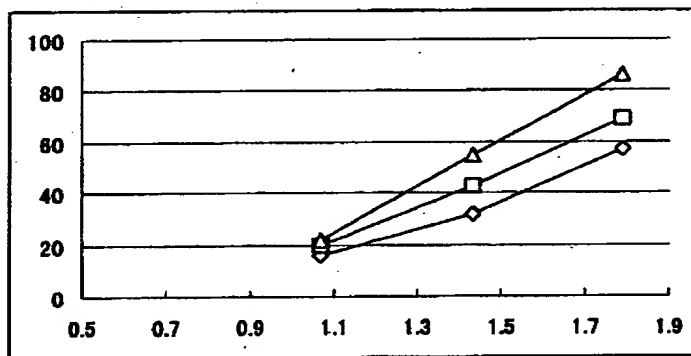
【図 8】

BSA タンパク



【図 9】

500bp DNA



特2000-112337

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 誘電泳動電極により形成された不均一電界内に分離すべき物質を含む液体を存在させ、該物質に働く誘電泳動力によって分離を行う装置において、物質の捕集能力を向上させた誘電泳動装置を提供する。

【解決手段】 基板上に電極を設けた誘電泳動装置において、対向する前記電極間に、該電極よりも低い部位を形成し、不均一電界領域の増加を実現して捕集能力を向上させた。

【選択図】 図 3

特2000-112337

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-112337
受付番号	50000469744
書類名	特許願
担当官	第三担当上席 0092
作成日	平成12年 4月17日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成12年 4月13日

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000252300]

1. 変更年月日	1990年 8月 7日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
氏 名	和光純薬工業株式会社